# II. Transformacja bakterii – klasyczny przykład klonowania subkomórkowego

***Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek***

Transformacja bakterii jest procesem pojawienia się nowego markera genetycznego wskutek pobrania DNA ze środowiska do komórki. Istotną cechą tego procesu jest to, że pobierany do komórek jest tzw. „goły" DNA, tzn. że nie jest on przyłączony do żadnego nośnika. Stan, w którym komórka posiada zdolność do pobrania obcego DNA nazywany jest kompetencją. U niektórych drobnoustrojów stan kompetencji występuje naturalnie na określonych etapach wzrostu i jest jednym z elementów naturalnego systemu transformacji i rekombinacji materiału genetycznego. Przykładem naturalnej zdolności do transformacji są gram-dodatnie komórki bakterii *Streptococcus*, które stają się kompetentne przy osiągnięciu gęstości komórek pomiędzy $10^7$ a $10^8$. U innych bakterii, gram-ujemnych *Haemophilus influenzae,* następuje indukcja stanu kompetencji podczas głodzenia komórek, o ile w tym stadium nie zostaje zaburzony system syntezy białek. Podobnie u *Azotobacter,* można mówić o naturalnym stanie kompetencji, gdy hodowla bakterii osiągnie stacjonarną fazę wzrostu. We wszystkich powyższych systemach wniknięciu do komórek podlega wyłącznie DNA homologiczny i jest to element procesu nazywanego rekombinacją homologiczną. Rekombinacja jest zjawiskiem powszechnym, występującym zarówno u bakterii gram-dodatnich jak i gram-ujemnych, przy czym obserwuje się pewne różnice w przebiegu procesu u obu wymienionych grup. Kompetencja nie występuje u wszystkich drobnoustrojów w sposób naturalny, brak jej np. u *Escherichia coli*.

W warunkach laboratoryjnych często zachodzi konieczność wprowadzenia do komórek (w tym komórek bakteryjnych) obcego DNA, najczęściej w postaci konstrukcji genowej – wektora zawierającego analizowany fragment DNA. Transformacja bakterii, a następnie replikacja obcego DNA w komórce, jest drugim, poza techniką PCR, sposobem powielania DNA w warunkach in vitro. Proces powielenia obcego materiału genetycznego w komórce bakteryjnej często określany jest jako proces klonowania subkomórkowego. W praktyce laboratoryjnej powszechnie wykorzystuje się fakt, że komórki drobnoustrojów mogą nabywać kompetencję na skutek działania pewnych czynników, takich jak na przykład zamrażanie i rozmrażanie komórek w obecności glikolu polietylenowego (np. u bakterii *Argobacterium tumefaciens*). W przypadku najczęściej wykorzystywanego w procedurach laboratoryjnych drobnoustroju – *E. coli,* do uzyskania kompetencji stosuje się zazwyczaj jony wapnia (pochodzące z soli o wysokich stężeniach, np. $CaCl_2$), których aktywność potęgowana jest szokiem termicznym: działaniem niską (0–5°C), a następnie podwyższoną temperaturą (42°C).

Na stan kompetencji (i wydajność późniejszej transformacji) wpływa wiele różnych czynników, takich jak szczep drobnoustroju, rodzaj wprowadzanego DNA (a tu istotne są takie cechy, jak: forma wektora molekularnego – liniowa lub kolista, długość wektora, obecność markerów selekcyjnych, stopień oczyszczenia, czyli jakość zastosowanego do transformacji DNA). Równie istotne są takie parametry, jak: sposób prowadzenia hodow-

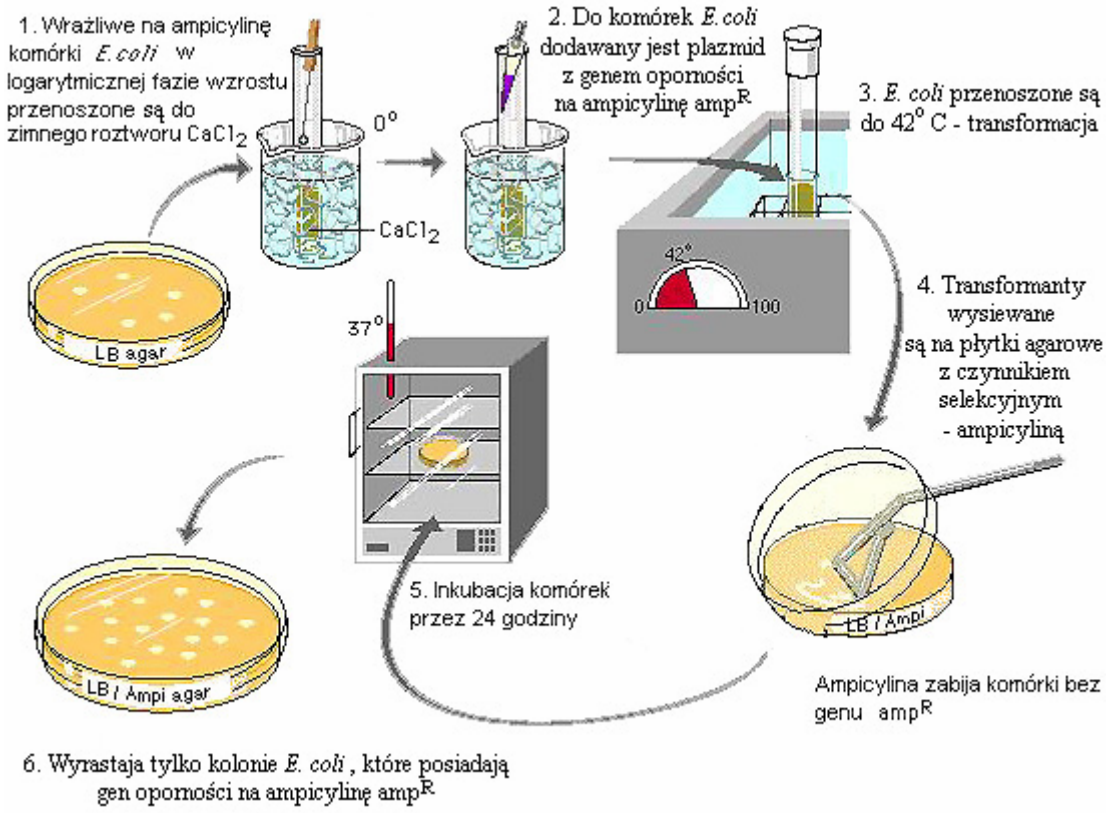
li, obecność wirusów lub mutagenów w środowisku. Stwierdzono, że przetrzymywanie komórek na lodzie wpływa pozytywnie na wydajność późniejszej transformacji. Niskie temperatury hodowli (w przypadku *E. coli* 18°C) wpływają na ogół korzystnie na kompetencję. Przechowywanie oraz hodowla komórek bakteryjnych przed etapem transformacji ma istotne znaczenie. Najbardziej optymalnym sposobem przechowywania bakterii *E. coli* jest sporządzanie zawiesiny komórek w czystym podłożu wzrostowym z dodatkiem 20% glicerolu i przeniesienie do temperatury rzędu -80°C.

Alternatywnym sposobem jest utrzymywanie powolnego wzrostu bakterii w półpłynnym agarze przetrzymywanym w temperaturze 20–25°C w ciemni. W obu przypadkach przed przystąpieniem do przygotowania bakterii do transformacji jest ich wysianie na świeże podłoże wzrostowe i hodowla do momentu wejścia w fazę wzrostu logarytmicznego, co monitorowane jest pomiarem gęstości optycznej hodowli (OD). Gęstość ta dla szczepów *E. coli* powinna wynosić około 1–5 x $10^8$ komórek/ml, co odpowiada wartości $OD_{550\text{-}600}$ = 0.5–0.7. Przechowywanie szczepów bakterii w formie tzw. ampułek glicerolowych bez ich rozmrażania praktycznie może być nieskończone, natomiast forma przechowywania w półpłynnym agarze umożliwia utrzymywanie żywych i aktywnych komórek bakteryjnych do lat pięciu. Zaleca się jednak czasowo przepasażować przechowywany szczep w celu „odmłodzenia" populacji komórek; należy również zwracać uwagę na to, aby nie doprowadzać do tzw. przerastania hodowli. Grozi to kontaminacją głównie bakteriami beztlenowymi, w tym *Clostridium*, a co za tym idzie błędnym bankowaniem komórek przeznaczonych do transformacji.

Jak wspomniano, najczęstszą metodą transformacji bakterii *E. coli* jest dodatek wielu dwuwartościowych jonów $Ca^{2+}$. Jony wapnia powodują strukturalne zmiany w ścianie komórkowej *E. coli*, co pozwala na wniknięcie DNA (np. plazmidu) do wnętrza komórek bakterii. Jony wapnia neutralizują ujemne ładunki w DNA oraz odpowiednie ładunki po zewnętrznej stronie błon komórkowych, co ułatwia zbliżenie się DNA do powierzchni komórek. Obecność dwuwartościowych jonów oraz niskiej temperatury powoduje tworzenie ośrodków krystalizacji w pobliżu komórek bakterii, co z kolei tworzy pory w błonie komórkowej i umożliwia wniknięcie DNA do wnętrza komórki. W procedurze transformacji bakterii wyróżnia się trzy główne etapy:

- przygotowanie komórek kompetentnych (indukcja zdolności do przyjęcia obcego DNA),
- transformacja komórek kompetentnych (wprowadzenie DNA do komórek),
- selekcja transformantów (odnalezienie i namnożenie tych komórek, które uległy transformacji).

Schemat postępowania uwzględniający otrzymywanie komórek kompetentnych i ich transformację przedstawia rycina 3.


1. Wrażliwe na ampicylinę komórki E.coli w logarytmicznej fazie wzrostu przenoszone są do zimnego roztworu CaCl2
0°
CaCl2
2. Do komórek E.coli dodawany jest plazmid z genem oporności na ampicylinę ampR
3. E. coli przenoszone są do 42° C - transformacja
42°
0
100
4. Transformanty wysiewane są na płytki agarowe z czynnikiem selekcyjnym - ampicyliną
LB agar
37°
5. Inkubacja komórek przez 24 godziny
LB / Ampi agar
LB / Amp!
Ampicylina zabija komórki bez genu ampR
6. Wyrastają tylko kolonie E. coli, które posiadają gen oporności na ampicylinę ampR

*Ryc. 3.* Schemat procesu transformacji bakterii metodą szoku termicznego w obecności wysokich stężeń jonów $Ca^{2+}$.

Większość szczepów *E. coli* wykazuje wydajność transformacji rzędu $10^5$–$10^8$ transformantów/μg plazmidowego DNA, zależnie od użytej techniki i ze względu na różne, omówione wcześniej, czynniki. Wykazano, że najbardziej krytycznym momentem transformacji drobnoustrojów jest przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* .

Opracowano wiele procedur laboratoryjnych, które zwiększają wydajność transformacji; na przykład użycie innych kationów: $K^+$, $Mg^{2+}$ czy $Mn^{2+}$ lub takich związków, jak LiCl, glutaminian litu, $RbCl_2$, zwiększa znacząco, bo aż około 1000 razy wydajność transformacji.

Wysoko wydajna i łatwa do przeprowadzenia transformacja została opracowana przez D. Hanahan. Polega ona na użyciu organicznego rozpuszczalnika – dimetylosulfotlenku (DMSO). Uzyskiwana wydajność wynosi do ok. $10^8$ transformantów/μg plazmidowego DNA. Podobne efekty przynosi zastosowanie w buforze do transformacji dodatku ditiotreitolu (DTT). Należy podkreślić, że zarówno DMSO, jak i DTT zwiększają transformację *E. coli* szczepów: DH5α, czy HB101, natomiast szczepy DH10B oraz MC1061 i ich pochodne w obecności wymienionych związków chemicznych tracą kompetencję, w związku z czym maleje ich zdolność do transformacji.

Technika transformacji, zaproponowana przez badacza Inoue, pozwalająca również uzyskać wysoką wydajność procesu transformacji, polega m. in. na prowadzeniu kultury bakterii w 18°C zamiast standardowych 37°C. Technika ta umożliwia uzyskanie ok. 100–1000x wyższej wydajności transformacji w porównaniu z tradycyjną metodą z zastosowa-

niem $CaCl_2$. Komórki kompetentne otrzymane zgodnie z techniką opracowaną przez Inoue i wsp. są często nazywane komórkami „ultrakompetentnymi".

Inną techniką wykorzystywaną do transformacji komórek, będącą alternatywą do metod chemicznych, jest metoda fizyczna – elektroporacja. Polega ona na wykorzystaniu prądu elektrycznego jako czynnika wymuszającego transfer DNA ze środowiska do komórek bakteryjnych. Przygotowując bakterie do elektroporacji prowadzi się ich hodowlę do fazy wzrostu logarytmicznego, a następnie umieszcza się komórki w buforze zawierającym 10% glicerolu. Tak przygotowane drobnoustroje poddaje się działaniu krótkich impulsów wysokiego napięcia prądu elektrycznego (12,5–15 kV/cm), które prowadzą do przejściowej destabilizacji błon komórkowych i umożliwiają wniknięcie DNA do wnętrza. Optymalna wydajność transformacji jest uzyskiwana dzięki użyciu specjalnych kuwet do elektroporacji i prowadzeniu całego procesu w temperaturze od 0°C do 4°C (w temperaturze pokojowej wydajność procesu spada przeciętnie 100 razy). W elektroporacji szczególnie ważne jest, aby używać do transformacji oczyszczonego DNA, a przede wszystkim, aby był on pozbawiony wszelkich soli; ich obecność wpływa na wzrost przewodnictwa elektrycznego i może doprowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia komórek. Stosowany DNA powinien być również pozbawiony resztek fenolu, chloroformu, etanolu czy detergentów, bufor zaś, w którym zawieszony jest DNA, powinien mieć jak najmniejszą siłę jonową. Metoda elektroporacji jest najbardziej efektywną ze wszystkich technik transformacji bakterii, pozwala uzyskać wydajność rzędu 1–3 x $10^9$ transformantów/μg plazmidowego DNA.

Podobnie jak dla metody chemicznej, wydajność transformacji w przypadku elektroporacji zależy tak od „parametrów" opisujących wprowadzaną cząsteczkę DNA, jak i od charakterystyki szczepów poddanych elektrotransferowi. W porównaniu z metodą chemiczną, do efektywnej transformacji bakterii elektroporacja wymaga mniejszych ilości DNA, wystarczy bowiem stosowanie stężeń DNA nawet rzędu 5 pg/transformację, przy czym wzrost stężenia automatycznie zwiększa wydajność transformacji. W przypadku elektroporacji mniejsza jest również zależność wydajności transformacji od wielkości wprowadzanej cząsteczki DNA; odpowiednio dla metody chemicznej, wraz ze wzrostem wielkości DNA, spada znacząco wydajność transformacji. Istotniejszym parametrem staje się jednak rodzaj szczepu użytego do elektroporacji. Przeżywalność bakterii z grubszą ścianą komórkową, jaka jest charakterystyczna np. dla szczepu *E. coli* JM109, jest wyższa (w obecności działającego impulsu elektrycznego), a przez to względna wydajność transformacji rośnie. Często jednak ze względu na dodatkowe utrudnienia w izolacji DNA z takich komórek transformantów do elektroporacji wybiera się inne szczepy, a wśród nich *E. coli* MC1061 czy DH10B. Hodowla tych dwóch ostatnich szczepów w obecności $Mg^{2+}$ daje najwyższą wydajność transformacji rzędu 1–5 x $10^{10}$ kolonii bakteryjnych transformantów/μg DNA, natomiast w metodzie chemicznej wartość ta wynosi odpowiednio: 1–10 x $10^8$ transformantów/μg DNA.

Do transformacji niektórych komórek wykorzystywać można również inną technikę wprowadzania DNA, nazywaną techniką balistyczną (*gene-gun*). Polega ona na opłaszczaniu cząsteczek stałych (np. złota) wprowadzanym DNA, a następnie wstrzeliwaniu ich do wnętrza komórek Metoda ma stosunkowo niską wydajność i nie jest stosowana w przypadku *E. coli*, jest natomiast przydatna w przypadku komórek trudno ulegających transformacji. Jest też powszechnie wykorzystywana do transformacji komórek roślin.

## PIŚMIENNICTWO

[1] *Hanahan D.*: Techniques for transformation of E. coli. [in:] DNA Cloning: A Practical Approach (Ed. D. M. Glover), vol. 1. IRL Press, Oxford 1987. – [2] *Hardin C., Pinczes J., Riell A.* et al.: Cloning, gene expression and protein purification. Experimental procedures and process rationale. Oxford University Press, New York 2001. – [3] *Inoue H., Nojima H., Okayama H.*: High efficiency transformation of *Escherichia coli*. Gene. 1990; 96: 23–28. – [4] *Karcher S.J.*: Molecular biology. A project approach. Academic Press, San Diego 1995. – [5] *Sambrook J., Russell D.W.*: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001.